

油桃果实顶腐形成原因分析

余兴¹, 贾云生², 吴湘琴², 贾兵², 叶振风², 朱立武¹

(1. 安徽省地质实验研究所, 安徽合肥 230001; 2. 安徽农业大学园艺学院, 安徽合肥 230036)

摘要 [目的]探讨油桃果实顶腐形成的原因。[方法]以中油5号油桃果实为试材,分别测定正常油桃与顶腐油桃果实中Ca含量;从顶腐油桃上分离纯化得到致病菌,采用CTAB法提取菌丝DNA,对其进行rDNA-ITS鉴定,利用NCBI在线Blast工具进行致病菌rDNA-ITS同源性比较。[结果]病果果实中Ca元素含量显著低于对照;腐烂坏死部位分离出2种不同类型菌丝,分别为弱寄生菌“黑变病”与“黑酵母菌”。[结论]油桃顶腐主要是由缺钙诱发后弱寄生菌感染造成的。

关键词 油桃;顶腐;Ca;弱寄生菌

中图分类号 S662.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)10-0152-03

Analysis on Top Rot of Nectarine Fruits

YU Xing¹, JIA Yun-sheng², WU Xiang-qin² et al (1. Anhui Institute of Geological Experiment, Hefei, Anhui 230001; 2. College of Horticulture, Anhui Agriculture University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract [Objective] The aim was to explore the formation causes of nectarine fruit top rot. [Method] The fruit of nectarine cultivar 'Zhongyou-5' was as testing materials, and Ca content in fruit between the normal and top rot nectarine were determined. The pathogenic bacteria was isolated and purified from the top rot nectarine, the mycelium DNA was extracted by CTAB method, and the rDNA-ITS sequence was analyzed and identified, and the homology was compared by the NCBI Blast online tools. [Result] Ca content in the disease fruit was significantly lower than in the control; two kinds of different types mycelium were separated from fruit decay and necrotic areas, which the weak parasitic fungus was respectively melanosis and black yeast. [Conclusion] Nectarine top rot is mainly caused by calcium-deficiency, then is infected by the weak parasite.

Key words Nectarine; Top rot; Ca; Weak parasite

我国油桃栽培始于20世纪70年代,20世纪80年代先后推出了曙光、华光、艳光、瑞光系列、秦光系列、中油系列的多系列甜油桃品种。到20世纪90年代,油桃保护地栽培迅速崛起,成为栽培的主要方式之一,在生产中所占的比例越来越大,其中,陕西渭南油桃保护地栽培占栽培总量的90%以上^[1]。安徽省砀山县是传统水果种植大县,其中保护地油桃种植面积近万亩,经济效益较高。

Ca是一种不易被植物吸收且吸收后又不易移动的元素,大量的Ca存在于叶中,果实中甚少。Ca只能单向(向上)转移,并受蒸腾作用的影响,常常会发生低蒸腾果实中的Ca向树体倒流的现象,因而果实极易表现出缺Ca症状。在果树栽培中仅由此所造成的果实腐烂等损失占产量的20%~30%,经济损失严重^[2]。保护地栽培,油桃生长速度就减缓,果实发育变慢,成熟期推迟。同时由于光照不足,枝条出现不同程度的徒长,叶片变大变薄,光合速率明显下降,致使果实发育和营养生长间出现不平衡^[3]。砀山县油桃顶腐现象较严重,尤其是大棚油桃发病率远远高于露地油桃。笔者对顶腐油桃中Ca含量进行了测定,并对果实顶腐部位病菌进行了分离、纯化和rDNA-ITS序列分析,探讨了油桃果实顶腐形成原因,以期为大棚油桃生产预防顶腐提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 植物材料为安徽省砀山县园艺场大棚栽培的中油5号顶腐果实和正常果实。ITS1和ITS4引物由上海生物工程技术有限公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 果实Ca含量测定。取中油5号顶腐果实和正常果

实,用去离子水清洗油桃果面3次,削去表皮,切取果肉,后混样,设3次重复,Ca元素含量采用电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)测定^[4]。

1.2.2 病原菌的分离与纯化。在无菌条件下,取新鲜病果(分发病轻、发病重2组),用70%乙醇擦拭病组织表面,分别切取发病轻、发病重的病果病部表皮以及重病果削去表皮后染病果肉,依次接种至代号为“1-1”“1-2”“1-3”的PDA培养皿(图1),放入25℃恒温培养箱中培养,待菌落直径长至1cm时,挑取菌落边缘菌丝于PDA培养基上进行纯化培养^[5]。重复操作3次可得到纯化菌株。

1.2.3 形态学鉴定。将纯化的病原菌接种于PDA平板培养基上,25℃培养5~6d,期间观察记录菌落在培养基上的生长情况;在Olympus BX51显微镜下观察菌丝形态。

1.2.4 分子生物学鉴定。采用CTAB法提取“1-1”“1-2”“1-3”PDA培养基上的菌株T₁、T₂、T₃的DNA。应用rDNA-ITS通用引物ITS1(5'-TCCGTAGCTGAACCTGCCG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'),进行PCR扩增^[6]。采用20μL反应体系:10×Buffer 2μL, MgCl₂ 2μL, 0.25mmol/L dNTP, Taq酶1U, 1μL DNA模板, ITS1和ITS4引物各0.2μmol/L。反应程序:94℃预变性3min;94℃变性1min, 55℃退火30s, 72℃延伸1min, 30个循环;72℃终延伸10min。扩增完成后,取5μL扩增产物于1%琼脂糖凝胶上电泳检测,用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化目的片段,回收纯化产物送上海英骏生物公司测序。

1.2.5 rDNA-ITS序列与系统发育分析。在GenBank网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的数据库中进行测序结果的比对,利用NCBI提供的Blast工具,在线搜索同源性较高的已知序列,将目标序列和搜索到的同源序列以FASTA格式

作者简介 余兴(1979—),女,安徽合肥人,工程师,硕士,从事果树园质营养研究。

收稿日期 2017-01-31

编辑成为一个文本文件,用软件 ClustalX 1.83 对序列进行多重比较;去掉两端的引物序列后,利用 BioEdit 程序和 MEGA 3.1 软件以非加权配对算术平均法构建系统聚类树,分析其亲缘关系^[7]。

2 结果与分析

2.1 Ca 含量测定 结果表明,正常果实和顶腐果实中的 Ca 平均含量分别为 88.9 和 60.2 mg/kg,病果果实中 Ca 含量比正常果实降低了 32.3%,且二者之间 Ca 含量的差异达到了

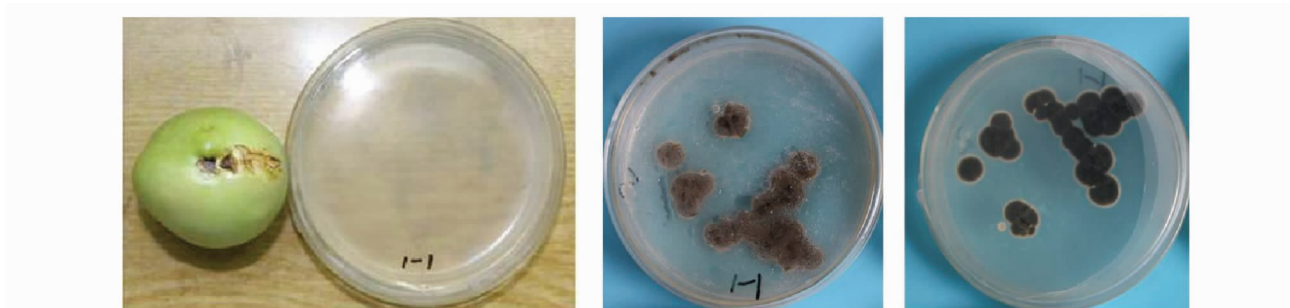
显著性水平。

2.2 病原菌的分离与形态学观察 病果病部表皮病原菌的分离与形态学观察结果(图 2、3)显示,从病部切取获得的组织经分离纯化培养 5 d 后,表皮病原菌菌落均呈深灰绿色,周边乳白色,短绒毛状,有少量环形沟纹,菌落背面黑色;生长较快。初步判断,发病轻与发病重的病果病部表皮分离的病原菌是同一种病原菌。



图 1 病原类型种类

Fig. 1 Pathogenic types

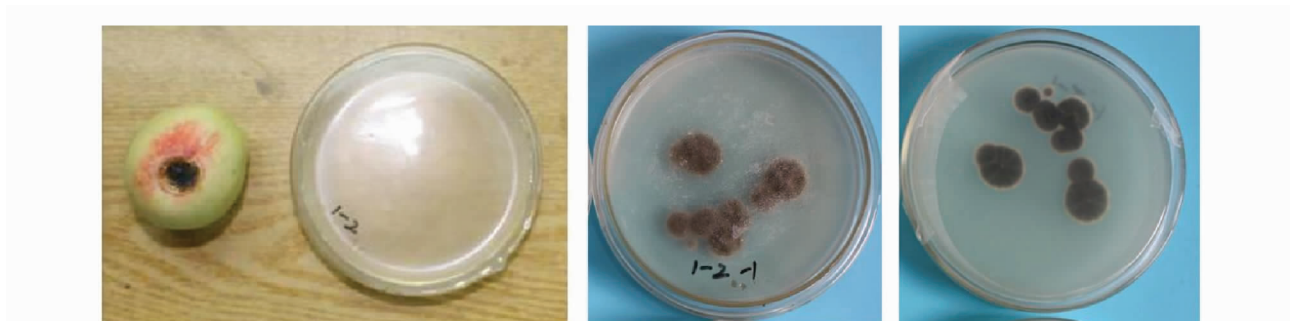


注:代号为“1-1”的 PDA 培养物

Note: PDA culture of No. 1-1

图 2 发病轻的病果病部分离纯化的白色菌丝生长情况

Fig. 2 The growth of white mycelium isolated and purified from lightly diseased fruit



注:代号为“1-2”的 PDA 培养物

Note: PDA culture of No. 1-2

图 3 发病重的病果病部分离纯化的菌丝生长情况

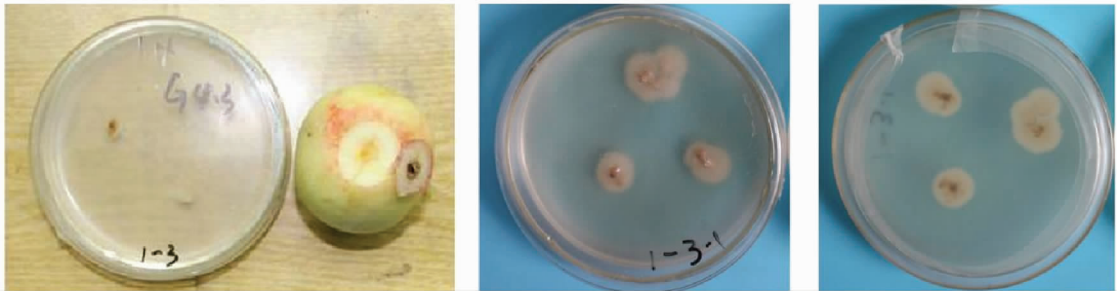
Fig. 3 The growth of mycelium isolated and purified from heavily diseased fruit

病果病部果肉病原菌的分离与形态学观察结果(图 4)显示,其菌落和周边均呈现乳白色,短绒毛状,反面也是乳白色;生长较表皮病原菌菌落生长慢。初步判断,表皮病原菌与果肉病原菌是 2 种不同的病原菌。

2.3 病原菌 rDNA - ITS 序列分析 对“1-1”和“1-2”PDA 培养基上的菌丝进行转接提纯,培养 5 d 后提取菌丝基因组 DNA,以得到的 DNA 为模版,应用特异引物经 PCR 扩增,产物经电泳均获得 1 条分子量为 446 bp 的条带,转化测

序后,经 rDNA - ITS 序列分析比对(图 5),为麦类黑变病菌

属(*Cladosporium cladosporioides*),即油桃“黑变病”。



注:代号为“1-3”的 PDA 培养物

Note: PDA culture of No. 1-3

图 4 发病重的果肉病部分离纯化的菌丝生长情况

Fig. 4 The growth of mycelium isolated and purified from heavily diseased fruit

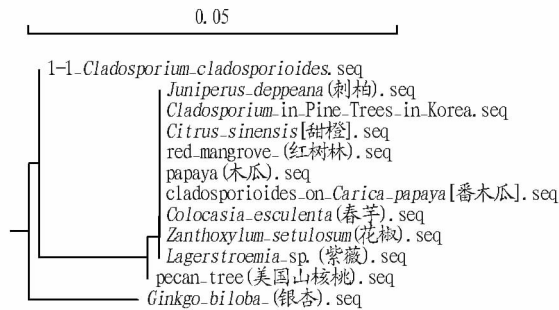


图 5 基于 ITS 序列分析构建的黑变病的分类进化树

Fig. 5 Classification of the evolutionary tree for *Cladosporium cladosporioides* based on ITS sequence analysis

对“1-3”PDA 培养基上的菌丝进行转接提纯,培养 5 d 后提取菌丝基因组 DNA,测序得分子量为 476 bp,转化测序后,经 rDNA - ITS 序列分析比对(图 6),为出芽短梗霉菌(*Aureobasidium pullulans*),即油桃“黑酵母菌”。

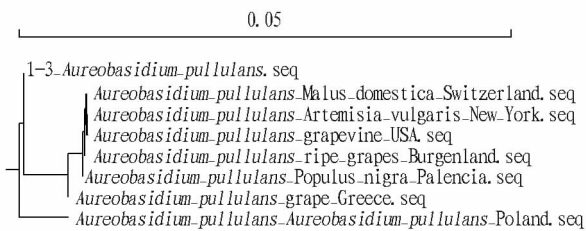


图 6 基于 ITS 序列分析构建的黑酵母菌分类进化树

Fig. 6 Classification of the evolutionary tree for *Aureobasidium pullulans* based on ITS sequence analysis

该 2 种真菌均为弱寄生菌,当油桃果实表皮受到机械损伤或组织疏松腐烂时,会感染果肉,导致果实发病。

3 结论与讨论

在砀山地区,大棚内油桃果实顶腐现象明显多于露地栽培,可能与 Ca 的吸收特点有关,因为 Ca 的运送速率在很大程度上受蒸腾速率的支配,土壤干旱时或者设施内高湿条件下,易引起缺 Ca,如果实套袋后,幼果蒸腾被抑制,吸收 Ca 的能力均会减弱^[2]。通风透光条件差的果园,其容易缺 Ca^[8]。同时,对 Ca 吸收的减少易造成油桃果实膜透性增加,果实抗

腐能力下降,感病的概率也随之增加,更容易被弱寄生病菌所侵染。因此,中油 5 号油桃顶腐主要由缺 Ca 诱发弱寄生菌“黑变病”和“黑酵母菌”侵染造成的。

廖亚运等^[9]研究表明,在桃生长发育过程中叶片和果实表面喷施不同浓度的 Ca 溶液,能增加果实 Ca 含量,使细胞结构和功能得到有效保护,其中以 0.015 mol/L 螯合钙处理效果较明显,整个发育期以幼果期喷钙效果最显著。潘家荃等^[10]研究了 75% 拿敌稳 WG 5 000 倍和 Wuxal Calcium 2 000 倍组合、75% 拿敌稳 WG 5 000 倍、Wuxal Calcium 2 000 倍、钙尔美 2 000 倍、好力克 5 000 倍和钙尔美 2 000 倍组合 5 个处理对苹果苦痘病的防治效果,以 Wuxal Calcium 单剂 2000 倍稀释液处理效果最好。李中勇等^[11]研究表明,采前土壤施 Ca 可显著提高贮藏期设施油桃的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性,并显著降低设施油桃果实的质膜透性及过氧化产物丙二醛的积累,改善设施油桃果实贮藏品质,延长设施油桃果品货架期。因此,设施油桃生产中,幼果期喷 Ca 是必要的,对预防顶腐病,提高果实贮藏性有很好的效果。

参考文献

- [1] 王田利. 我国油桃产业发展、变化及特点分析[J]. 山西果树, 2015(1): 15-16.
- [2] 罗志军, 田秀英. 果树钙素营养研究进展[J]. 北方园艺, 2006(1): 56-58.
- [3] 朱更瑞, 方伟超, 陈昌文, 等. 大棚油桃生长发育的特点[J]. 果树学报, 2006, 23(4): 527-530.
- [4] 陈计峦, 吴继红, 江英, 等. 微波消解/CP-MS 法检测八种梨果实中主要矿物质元素含量[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(2): 496-498.
- [5] 张正光, 郭成宝, 王源超, 等. 非洲菊根腐病原菌的鉴定与 ITS 序列分析[J]. 植物病理学报, 2005, 35(5): 392-396.
- [6] 罗竟, 王超, 何凡, 等. 海南番木瓜疫病病原菌鉴定与 ITS 序列分析[J]. 中国南方果树, 2015, 44(6): 6-9.
- [7] 梁茵, 王芳, 李安娜, 等. 耐热真菌的分类鉴定及 rDNA - ITS 系统发育分析[J]. 菌物学报, 2011, 30(4): 542-550.
- [8] 郑建梅, 史西月. 苹果缺钙原因及补钙措施[J]. 河北果树, 2016(4): 10-11.
- [9] 廖亚运, 张斌斌, 马瑞娟, 等. 采前喷钙对金陵黄露桃钙吸收及细胞超微结构的影响[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(5): 1171-1176.
- [10] 潘家荃, 李广旭, 杨华, 等. 几种药剂防治苹果苦痘病的对比试验[J]. 辽宁农业科学, 2014(6): 41-44.
- [11] 李中勇, 高东升. 土壤施钙对设施油桃贮藏期间果实抗氧化系统的影响[J]. 河南农业科学, 2014, 43(6): 116-119.